



REC'D 26 JUN 2000

WIPO

PCT

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 199 21 419.0

Anmeldetag: 08. Mai 1999

Anmelder/Inhaber: Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg,
Heidelberg, Neckar/DE

Bezeichnung: Verfahren zum spezifischen Nachweis und
zur Identifizierung retroviraler Nukleinsäuren/
Retroviren in einem Untersuchungsgut

IPC: C 07 H, C 12 N, C 12 Q

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Anmeldung.

München, den 15. Juni 2000
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Heiler

Seller

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



"Verfahren zum spezifischen Nachweis und zur Identifizierung retroviraler Nukleinsäuren / Retroviren in einem Untersuchungsgut"

5

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum spezifischen Nachweis und zur Identifizierung retroviraler Nukleinsäuren / Retroviren in einem beliebigen Untersuchungsgut und Diagnosekits zur Durchführung dieses Verfahrens. Sie betrifft außerdem retroviruspezifische Sonden für die Reverse Dot Blot Hybridisierung und retroviruspezifische, Vorwärts- und Umkehrprimer umfassende Oligonukleotid-Primer-mischungen (MOP) für die Erzeugung von Amplifikaten retroviruspezifischer Nukleinsäuren aus dem Untersuchungsgut.

- 15 Exogene und endogene Retroviren (HERV) sind ätiologisches Agens für eine Vielzahl von tumorigenen Erkrankungen bei Mensch und Tier. In zahlreichen Tiermodellen, aber auch beim Menschen (HTLV-I und II) sind sie an der Entstehung von Tumoren und Leukämien beteiligt. Andere hingegen verursachen Immundefizienz-erkrankungen (HIV). Gegenwärtige Untersuchungen lassen den Schluß zu, daß Retroviren auch als Auslöser
- 20 von Autoimmunerkrankungen (Kalden und Herrmann, 1993) und neuronalen degenerativen Erkrankungen wie multipler Sklerose (Tuke et al. 1997) eine Rolle spielen können. Intensive Forschung auf dem Gebiet der endogenen und exogenen Retroviren führte bislang zur Entdeckung laufend neuer retroviraler Sequenzen im menschlichen Erbgut, deren Expression möglicherweise mit bestimmten Erkrankungen assoziiert sein
- 25 könnte. So ist die Expression von Gag-Proteinen der HERV-K Familie mit fast allen Formen testikulärer und ovarieller Keimzelltumoren assoziiert (Sauter et al. 1995). In menschlichen Seren wurden Antikörper gegen HERV-K Env Protein nachgewiesen (Vogetseder et al. 1993). Das *env* Gen von HERV-K-IDD, das aus Patienten mit Diabetes Typ-1 isoliert wurde, kodiert möglicherweise für ein endogenes Superantigen
- 30 (Conrad et al. 1997).

Zur Korrelation bestimmter Erkrankungen mit der Aktivität bestimmter endogener oder exogener Retroviren sind statistisch abgesicherte Studien mit großen Patientenkollektiven notwendig. Der hierfür erforderliche Zeit- und Kostenaufwand mit den im Stand der Technik bekannten Nachweisverfahren ist immens.

5

Der zunehmende Einsatz retroviraler Vektorsysteme in der humanen Gentherapie wirft Fragen hinsichtlich der Sicherheit vor unerwünschten Nebenwirkungen (Genomveränderungen in den Zielzellen, Übertragung unerwünschter Viren) auf. So werden in Verpackungszelllinien zu einem gewissen Prozentsatz auch unerwünschte Genabschnitte endogener oder fremder Retroviren in die therapeutisch zu applizierenden retroviralen Partikel mitverpackt (Co-packaging, Sherwin et al. 1987, Scolnick et al. 1979, Takeuchi et al. 1992). So konnten Transkripte bestimmter endogener Retroviren, wie sie in verwandter Form auch im Genom von Verpackungszelllinien vorhanden sind, in Retrovirus-ähnlichen Partikeln (Pseudotypen) der Brustkrebszelllinie T47D nachgewiesen werden (Seifarth et al. 1995, 1998). Die Verpackung solcher unerwünschten retroviralen Sequenzen kann zur Rekombination und zur Entstehung neuer Retroviren mit veränderten, möglicherweise pathogenen Eigenschaften, führen. Die Neuintegration solcher rekombinanten Retroviren im Genom der Zielzellen kann zu Insertionsmutagenese und dadurch zur Inaktivierung wichtiger Gene des Zellzyklus und möglicherweise zur Tumorgenese führen.

Aus diesem Grund ist es notwendig, mit einem empfindlichen Testsystem eine Qualitätskontrolle der gentherapeutisch einzusetzenden Genvektorpräparationen durchzuführen. Damit könnte vermieden werden, daß unerwünschte retrovirale Sequenzen transfundiert werden. Bei positivem Nachweis könnte eine Vektorpräparation vor der Gabe an den Patienten noch einer entsprechenden Reinigung (Purging) unterzogen werden. Die im Stand der Technik bislang bekannten Verfahren sind für einen solchen Einsatz nicht geeignet.

Eine gegenwärtig umstrittene Frage ist der Einsatz von Tierorganen für die Transplantation am Menschen (Xenotransplantation). So werden aus Ermangelung

geeigneter Spender dem Menschen vermehrt Herzklappen von Schweinen transplantiert. Auch die Übertragung von Herz-, Leber- und Nieren-Transplantaten ist geplant. Jüngste Untersuchungen ergaben aber, daß es im Rahmen der Transplantation und der damit verbundenen medikamentösen Immunsuppression beim Empfänger zur Aktivierung endogener oder bislang supprimierter exogener Retroviren im Spenderorgan kommen kann. Wie experimentell bereits nachgewiesen wurde, sind diese Retroviren tierischen Ursprungs pathogen für bestimmte menschliche Zelltypen (Xenotropismus) und könnten somit zu einer ernsthaften systemischen Erkrankung des Organempfängers führen. Im Falle der Bildung pathogener infektiöser Viruspartikel ist auch eine Übertragung auf unbeteiligte Dritte (Epidemie) nicht auszuschließen. Nicht zuletzt könnten Rekombinationen von Retroviren tierischen Ursprungs mit endogenen humanen Retroviren zu neuen pathogenen Virusrekombinanten mit völlig neuen Wirtstropismen führen.

Es besteht daher der Bedarf an schnellen, zuverlässigen und zugleich preisgünstigen Detektionssystemen, mit dem Transplantat-Träger regelmäßig auf eine Infektion mit Retroviren tierischen Ursprungs getestet werden können.

Für den Nachweis viraler Infektionen stehen im Stand der Technik bislang eine Reihe von Methoden des direkten und indirekten Virus-Nachweises zur Verfügung. Zum direkten Nachweis von Viruspartikeln, Produkten der viralen Replikation (virale Antigene) oder einer gegen das Virus gerichtete Immunantwort (antivirale Antikörper), gehören Elektronenmikroskopie (EM), Färbung viraler Proteine mit fluoreszierenden Antikörpern, „enzyme-linked immunosorbent assay“ (ELISA) und Radioimmunassays (RIA). Zum direkten Nachweis des Virus und seiner Nukleinsäuren werden auch zunehmend molekularbiologische Methoden, wie Nukleinsäurehybridisierungen mit Virus-spezifischen Sonden (Dot-Blot, Southern-Blot, Northern-Blot) sowie die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit Virus-spezifischen Primern durchgeführt.

Mit den indirekten Methoden werden in der Regel nicht die Viren selbst, sondern ihre Folgeerscheinungen, d. h. die durch eine Virusvermehrung (Replikation) induzierten Veränderungen (zytopathische Effekte) in Zellen nachgewiesen. Dies muß meist in einem

auf das nachzuweisende Virus zugeschnittenen *in vitro* Zellkultursystem durchgeführt werden. Dafür werden lebende Zellen, in denen das nachzuweisende Virus replizieren kann, benötigt. Je nach Virustyp sind Zellkulturen, Organkulturen, befruchtete Hühnereier oder sogar Labortiere für den Nachweis erforderlich. Das Erscheinungsbild des zytopathischen Effekts (Zell-Lyse, fokales oder diffuses Zellwachstum, Synzytienbildung, Abrundung) und das Wirtsspektrum des Virus wird als Indiz für die Identifizierung des Virusisolates herangezogen. Oft aber ist die genaue Identifizierung nur in Kombination mit serologischen oder molekularbiologischen Methoden (PCR) möglich.

10

Die relativ geringe Sensitivität einiger direkter Nachweismethoden (EM, Antikörperfärbung) macht es notwendig, daß das Untersuchungsmaterial für einen erfolgreichen Nachweis eine bestimmte Menge an Virus enthalten muß oder durch geeignete Methoden (Ultrazentrifugation) angereichert werden muß. Ist dies nicht praktikierbar, muß das Virus vorher in einem speziellen *in vitro* Zellkultursystem angezüchtet werden. Da viele Viren spezielle Wirtszelltropismen besitzen, ist für jedes zu testende Virus ein spezielles Testsystem notwendig. Dies resultiert in hohen Laborkosten, deren Auswertung zum Teil sehr zeitintensiv ist und sehr viel Erfahrung erfordert.

20

Serologische Methoden (ELISA, RIA) sind in der Regel hochsensitiv und haben sich zum gängigen Goldstandard in der Virusdiagnostik entwickelt. Der Nachteil aller serologischer Methoden ist aber, daß für jeden zu testenden Virus ein spezifischer Antikörper notwendig ist. In einem Testdurchlauf kann die zu untersuchende Probe somit nur auf ein putatives Virus getestet werden. Die Untersuchungen von ganzen Expressionsmustern ist mit diesen Methoden nur unter großem zeitlichen und finanziellen Aufwand möglich.

25

Entwicklungen auf dem Gebiet der Molekularbiologie haben zur Entwicklung neuer Nachweismethoden (Hybridisierungen, PCR) geführt, die eine ähnliche Empfindlichkeit wie serologische Antigen-Nachweismethoden besitzen. Auch hier steht und fällt der Nachweiserfolg mit der Verfügbarkeit Virus-spezifischer Sonden (Hybridisierung) oder Oligonukleotide (PCR). Da der Einsatz mehrerer Sonden oder PCR-Primer

30

aufgrund unspezifischer Wechselwirkungen in einem Reaktionsansatz limitiert ist, müssen zum Nachweis komplexer Expressionmuster ebenfalls viele Experimente parallel durchgeführt werden.

- 5 Angesichts der vorstehend geschilderten Umstände war es Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein leistungsfähiges und zuverlässiges, zugleich schnelles Verfahren zum multiplen Nachweis endogener und exogener Retroviren menschlichen und tierischen Ursprungs bereitzustellen.
- 10 Diese Aufgabe wird mit einem Verfahren der eingangs genannten Art gelöst, das dadurch gekennzeichnet ist, daß es die folgenden Maßnahmen umfaßt:
- Isolierung der Nukleinsäuren, nämlich DNS- und/oder RNS, aus dem Untersuchungsgut,
- Durchführung einer PCR mit der isolierten DNS oder einer RT-PCR mit der isolierten RNS unter Verwendung von einer oder beiden der nachfolgend dargestellten,
- 15 jeweils aus Vorwärtsprimern (forward primer) und Umkehrprimern (reverse primer) bestehenden Primermischungen MOP-ABD und MOP-C, deren Vorwärtsprimer und Umkehrprimer degenerierte Oligonukleotide mit den in den Sequenzprotokollen SEQ ID NO. 1 bis NO. 4 gemäß der IUPAC-Nomenklatur wiedergegebenen Nukleotidsequenzen sind, wobei
- 20 die Vorwärtsprimer der Mischung MOP-ABD die Nukleotidsequenzen gemäß SEQ ID NO. 1, nämlich: "Kopf"-ARAGTNYTDYCHMRGGH, mit 3456 Degenerationen aufweisen,
- die Umkehrprimer der Mischung MOP-ABD die Nukleotidsequenzen gemäß SEQ ID NO. 2, nämlich: "Kopf"-NWDDMKDITYATCMAYRWA, mit 27648 Degenerationen
- 25 aufweisen,
- die Vorwärtsprimer der Mischung MOP-C die Nukleotidsequenzen gemäß SEQ ID NO. 3, nämlich: "Kopf"-TKKAMMSKVYTRCYHCARGGG, mit 3072 Degenerationen aufweisen, und
- die Umkehrprimer der Mischung MOP-C die Nukleotidsequenzen gemäß SEQ ID
- 30 NO. 4, nämlich: "Kopf"-MDVHDBMDKYMAYVYAHKKA, mit 8192 Degenerationen aufweisen,

wobei "Kopf" für eine Nukleotidsequenz steht, die eine Schnittstelle für ein Restriktionsenzym und eine sog. Klammer-(clamp)-Sequenz (für die Stabilisierung der Schnittstellensequenz) am 5'-Ende dieser Schnittstelle umfaßt,

- Aufreinigung der erhaltenen (RT-) PCR-Amplifikate und Einsatz derselben in einem RDBH-Verfahren unter Verwendung immobilisierter RDBH-Sonden, die jeweils (je Sonde) synthetische Oligonukleotide umfassen, deren Nukleotidsequenz der retroviralen Nukleotidsequenz des retroviruspezifischen Reverse-Transkriptase-Gens der mit dem betreffenden Dot nachzuweisenden Virusart oder einem Abschnitt einer solchen retroviralen Nukleotidsequenz entspricht und keine Überlappung mit den Nukleotidsequenzen der in der PCR oder RT-PCR eingesetzten Vorwärtsprimern (forward primer) und Umkehrprimern (reverse primer) aufweist.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein Verfahren zum Nachweis von retroviralen Nukleinsäuren in einer Probe, wobei zuerst alle Nukleinsäuren (RNA und DNA) unter Einsatz gängiger, dem Fachmann bekannten Methoden, aus dem Untersuchungsgut extrahiert werden. Hierbei wird zwischen DNA und RNA unterschieden. Für den Nachweis von bereits ins Wirtszellgenom integrierten Retroviren (Proviren) ist die Isolation von genomischer DNA ausreichend. Soll die Aktivierbarkeit bislang ruhender Retroviren, die Transkriptionsaktivität endogener Retroviren oder die Identität retroviraler Partikel untersucht werden, muß polyadenylierte Boten-RNA (mRNA) isoliert werden, die frei von genomischer DNA ist. Im Falle der Verwendung von mRNA als Ausgangsmaterial muß diese mRNA *in vitro* mittels Reverser Transkriptase in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden und kann dann als Matrize für die sich anschließende PCR eingesetzt werden. Diese Kombination von reverser Transkription und PCR wird gemeinhin als RT-PCR bezeichnet.

Die isolierten Nukleinsäuren werden anschließend einer Ein-Schritt PCR unter Verwendung der erfindungsgemäßen Primermischungen (MOP-ABD, MOP-C) aus retrovirusspezifischen, degenerierten, zu den hochkonservierten Regionen innerhalb des Reverse Transkriptase Gens (RT-Gens) aller bekannten humanen Retroviren korrespondierenden Oligonukleotiden (MOP, Shih et al. 1989, Donehower et al. 1990), unterworfen. Bei dieser PCR werden sämtliche retroviruspezifischen

'Reverse Transkriptase' - homologen Sequenzabschnitte, die im Untersuchungsgut enthalten sind, amplifiziert. Als Ergebnis erhält man ein Amplifikatgemisch kurzer retroviraler DNA-Fragmente, das in seiner Zusammensetzung die Häufigkeit aller nachzuweisenden retroviralen Nukleotidequenzen in dem Untersuchungsgut
5 widerspiegelt. Die Amplifikate werden entweder bereits während der PCR-Reaktion oder im Anschluß daran markiert, vorzugsweise radioaktiv, wahlweise aber ebenso gut auch nichtradioaktiv (z.B. mit Biotin oder Digoxigenin). Anschließend werden diese markierten Amplifikate in einem Hybridisierungsverfahren (RDBH-Verfahren) unter Verwendung von Filtermembranen oder Bio-Chips mit aufgetragenen,
10 retroviruspezifischen Oligonukleotiden als Sonden eingesetzt.

Die aus Klammer- und Schnittstellensequenz bestehende Kopf- bzw. Extensionssequenz der erfindungsgemäßen Primeroligonukleotide, hat zum einen den positiven Effekt, daß sie die Primer-Matrizen-Bindungskinetik günstig beeinflusst, so daß die in dem ersten PCR-Zyklus gebildeten PCR-Produkte in den folgenden Zyklen noch wesentlich
15 effizienter amplifiziert werden. Damit ist der Vorteil verbunden, daß retrovirale Matrizen selbst dann amplifiziert werden bzw. werden können, wenn der exakt dazu passende Primer nicht in der Primermischung vorhanden ist. Die Schnittstelle hat außerdem den Vorteil, daß sie im Bedarfsfall die Durchführung einer Klonierung erleichtert.

Grundsätzlich gilt, daß die Länge der Kopf- bzw. Extensionssequenz die halbe Länge der
20 kompletten Primernukleotidsequenz nicht überschreiten sollte.

Wesentlicher Bestandteil des erfindungsgemäßen Verfahrens sind die für die Reverse Dot Blot Hybridisierung (RDBH) verwendeten RDBH-Sonden, bei denen es sich um bestimmte Mengen synthetisch erzeugter, genau definierter Nukleinsäuresequenzen aus
25 dem Reverse Transkriptase Gen derjenigen bereits charakterisierten Retroviren handelt, gegen die das Untersuchungsgut getestet werden soll. Diese retroviruspezifischen RDBH-Sonden sind auf definierten Feldern (Dots) der RDBH-Träger aufgebracht, wobei es sich sowohl um althergebrachte Filtermembranen mit Abmessungen von mehreren Zentimetern handeln kann, als auch um sogenannte Bio-Chips mit Abmessungen von
30 wenigen Millimetern ("Micro-Array-Technologie"). Im Fall von Filtermembranen werden die Sonden vorzugsweise kovalent durch UV-Crosslinking (z.B. mit der kommerziell

erhältlichen UV-Strahlungsquelle 'StratalinkerTM' , Stratagene) an diesen Träger gebunden.

Bei den DNA-Chips werden Oligonukleotid-Sonden in situ synthetisiert und mit genau definierten Positionen auf einem festen Träger mit Methoden der Photolithographie (ähnlich einer Gravur) fixiert, (z.B. indem unter Verwendung von Lochmasken bestimmte Bereiche des Chips belichtet werden, um photosensitive chemische Gruppen zu aktivieren). Der Träger, vorzugsweise eine Glas- oder Nylonoberfläche von ca. 1 cm², bildet die Hybridisierungseinheit. Jede Hybridisierungseinheit kann eine sehr hohe Zahl an unterschiedlichen Oligonukleotid-Sonden (bis zu 400.000) enthalten. Dadurch wird die gleichzeitige Analyse von vielen tausend verschiedenen Sequenzen ermöglicht. Für jede Sonde werden alle Sequenz-Alternativen auf dem Chip dargestellt, eine einzige davon muß von dem zu testenden Untersuchungsgut erkannt werden. Die Hybridisierung von Sonde und Zielsequenz (im Untersuchungsgut) wird über die Messung der Amplifikatmarkerintensität nachgewiesen. Die Intensität ist proportional zum Ausmaß der Hybridisierung zwischen Sonde und Zielsequenz. Jede Zielsequenz wird nach ihrer Hybridisierungsposition auf dem Chip identifiziert. Die Technik der DNA-Chips wurde von FODOR et al. (Science 251, 767-773, 1991) entwickelt und ist im Stand der Technik bekannt (vgl. V. Oeding et al., 1999, *HYGIENE UND MIKROBIOLOGIE* 1/99, S. 55-57 und G. Ramsay 1998, *NATURE BIOTECHNOLOGIE*, Vol. 16, 1998, S.40-44.).

Die Hybridisierung sollte unter hochstringenten, auf die Länge der Sonden abgestimmten Bedingungen erfolgen, und die hybridisierten Träger (Filtermembranen oder Chips) sollten anschließend unter Bedingungen hoher Stringenz gewaschen werden. Die Identität der nachweisbaren Retroviren kann – im Fall einer radioaktiven Markierung der PCR-Amplifikate - nach Exposition der Filtermembranen auf einem Röntgenfilm anhand der Signalmuster der Autoradiogramme identifiziert werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht den multiplen Nachweis und die Identifizierung aller bislang bekannten humanen und/oder tierspezifischen retroviralen Nukleinsäuren/Retroviren in Zellkulturen, Zellkulturüberständen oder Körperproben oder sonstigem Untersuchungsgut biologischen Ursprungs. Voraussetzung ist lediglich,

daß bestimmte Genomabschnitte der nachzuweisenden Retroviren, nämlich die konservierten Sequenzbereiche der Reversen Transkriptase, hinsichtlich ihrer DNA-Nukleotidsequenz bekannt sind. Diese Voraussetzung ist erfüllt, da die entsprechenden Nukleotidsequenzen exogener und endogener humaner Retroviren als Genbankdaten
5 allgemein zugänglich sind.

Das erfindungsgemäße Verfahren eröffnet erstmals die Möglichkeit der Bereitstellung eines universellen Retrovirus-Detektionssystems, mit dessen Hilfe in einem einzigen Experiment das gesamte Spektrum (= Expressionsmuster) aller aktiven endogenen und
10 exogenen retroviralen Nukleotidsequenzen im Untersuchungsgut (Körperprobe) erfaßbar ist. Mit diesem Detektionssystem können insbesondere auch statistisch abgesicherte Studien mit beliebig großen Patientenkollektiven durchgeführt werden und daraus gegebenenfalls bestehende Korrelationen zwischen bestimmten Erkrankungen und der Aktivität bestimmter endogener oder exogener Retroviren festgestellt werden. Im Falle
15 einer nachgewiesenen Korrelation eines bestimmten retroviralen Expressionsmusters mit einer bestimmten Erkrankung kann dieses Testsystem auch zur Früherkennung bzw. zur Abschätzung des persönlichen genetischen Risikos für eine solche Erkrankung eingesetzt werden.

20 Ein weiterer ganz entscheidenderer Vorteil des Verfahrens liegt darin, daß die erfindungsgemäßen PCR-Primer (MOP), d.h. die degenerierten Oligonukleotide der Primermischungen, die für die Amplifikation der zu identifizierenden retroviruspezifischen RT-Genabschnitte im Untersuchungsgut verwendet werden, in ihrer Sequenz nicht mit den Sequenzen der als Dot Blot Sonden eingesetzten
25 synthetischen virusspezifischen Oligomere überlappen. Die PCR-Primersequenzen tragen nämlich ungefähr zur Hälfte der endgültigen Amplifikatlänge bei. Wären diese Sequenzabschnitte auch in den Dotblot-Sonden enthalten (vgl. Herrmann und Kalden, 1994), würde dies zu erheblichen Einschränkungen in der Aussagekraft des Tests führen, da die Amplifikate dann zu einem gewissen Maße mit allen Dotblot-Sonden auf der
30 Filtermembran hybridisieren würden. Es ist der Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens, daß dieser unerwünschte Effekt durch die Verwendung synthetischer,

präzise definierter, homogener Oligonukleotidpräparationen für Vorwärts- (forward) und Umkehrprimer (reversed primer) einerseits und für die RDBH-Sonden andererseits verhindert wird.

- 5 Die Nukleotidsequenzen aller bislang charakterisierten exogenen und endogenen Retroviren (HERV) sind in Genbanken publiziert. Von ihnen können entsprechende Nukleotidsequenzen für die Synthese virusspezifischer Oligomere als Dot Blot-Sonden abgeleitet werden. Prinzipiell können entsprechende Oligomere all dieser Sequenzen auf eine einzige Filtermembran aufgedottet werden. Demzufolge ist es möglich, ein
- 10 Untersuchungsgut in einem einzigen Experiment auf das gesamte Spektrum bislang bekannter Retroviren zu testen. Im Vergleich zum Stand der Technik, demgemäß für die Identifizierung eines jeden in einer Probe vermuteten Virus ein eigener Diagosetest, insbesondere serologischer Test unter Verwendung eines speziellen Antikörpers, durchgeführt werden muß, stellt das erfindungsgemäße Verfahren somit einen
- 15 bedeutenden Fortschritt dar.

Aufgrund der bekanntermaßen hohen Sensitivität der PCR und der Möglichkeit der wiederholten Reamplifikation von PCR-Produkten wird mit dem erfindungsgemäßen Verfahren zudem eine Nachweisgrenze erreicht, die von kaum einem anderen Testsystem

20 erreicht wird.

Bei einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht der "Kopf"- oder Extensionsabschnitt der erfindungsgemäßen Primernukleotide aus der Nukleotidsequenz GAAGGATCC, wobei die Nukleotidfolge GAA eine sogenannte

25 'clamp' (=Klammer) darstellt und die Nukleotidfolge GGATCC die Schnittstelle für das Restriktionsenzym BamHI repräsentiert. Diese Kopf- bzw. Extensionssequenz hat sich in der Praxis sehr gut bewährt. Prinzipiell kann die Kopfsequenz aber aus jeder beliebigen Nukleotidsequenz bestehen, vorausgesetzt daß diese die Primer-Annealing-Kinetik nicht negativ beeinflusst.

Die Nukleotidsequenzen der synthetischen Oligonukleotide der RDBH-Sonden sind vorzugsweise so gewählt, daß sie zu der retroviralen Nukleinsäureregion des Reverse-Transkriptase-Gens zwischen den hoch konservierten Motiven V L P Q G und Y M/V D D I/V/L L oder zu einem Abschnitt dieser Region korrespondieren, d.h. damit
5 übereinstimmen und/oder (im Experiment) hybridisieren können.

Da die Effizienz einer Oligonukleotid-Synthese mit der Länge des zu synthetisierenden Oligonukleotids abnimmt, ist eine Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens vorgesehen, bei der als immobilisierte RDBH-Sonden jeweils (d.h. je Sonden bzw. je
10 Dot) eine Mischung aus äquimolaren Mengen zweier im Vergleich kurzkettiger synthetischer Oligonukleotide eingesetzt werden. Diese korrespondieren zusammen bzw. hintereinandergereiht zu einem längeren, vorzugsweise etwa 90 Basenpaare (bp) langen Abschnitt der Nukleinsäureregion des Reverse-Transkriptase-Gens zwischen den hoch konservierten Motiven V L P Q G und Y M/V D D I/V/L L.

15 In einer Ausführungsform, die sich in der Praxis sehr gut bewährt hat, sind diese beiden kurzkettigen Oligonukleotide annähernd gleich groß bzw. gleich lang, und umfassen vorzugsweise ca. 45 Basenpaare.

Die Erfindung wird im folgenden anhand von Ausführungsbeispielen und dazugehörigen
20 Figuren und Tabellen näher erläutert.

Die verwendeten Abkürzungen bedeuten:

BaEV = Baboon endogenes Retrovirus des Pavians;

ERV = endogenes Retrovirus,

25 ERV9 = endogenes Retrovirus Typ 9.

GaLV = Gibbonaffen Leukämie Virus;

HERV = humanes endogenes Retrovirus;

HIV = humanes Immundefizienz Virus;

HML = humane Maus Mammatumovirus-ähnliche Sequenz;

30 HPLC = High Performance Liquid Chromatography

HRV5 = humanes (exogenes) Retrovirus Typ 5;

HTLV-1 = humanes adultes T-Zellen-Leukämie-Virus Typ 1;

LINE = langes, diperses (verstreut liegendes) DNA-Sequenzelement;

MMTV = Mause Mammatumor-Virus;

MoMuLV = Moloney Mäuse LeukämieVirus;

- 5 MOP = Vorwärtsprimer (forward primer) und Umkehrprimer (reversed primer)
umfassende Primermischung aus degenerierten Oligonukleotiden

MPMV = Mason Pfizer Affen Virus;

PCR = Polymerase-Ketten-Reaktion

PERV = endogenes Schweine-Retrovirus (porcine endogenous retrovirus);

- 10 PBMNC = periphere mononukleäre Blutzellen (peripheral blood mononuclear cells);

RDBH = Reverse Dot Blot Hybridisierung

RT = Reverse Transkriptase

Es zeigen:

- 15 Tabelle 1: erfindungsgemäße Retrovirus-Typ-ABD- und -Typ-C-spezifische
Primermischungen MOP-ABD und MOP-C, die jeweils Vorwärtsprimer
(forward primer) und Umkehrprimer (reverse primer) umfassen und
degenerierte Oligonukleotide darstellen. Zur Beschreibung der degenerierten
Oligonukleotidsequenzen ist der standardisierte Einzelbuchstaben-
20 abkürzungscode der IUPAC Nomenklatur verwendet worden (siehe *European
Journal of Biochemistry* 150: 15,1985). Sowohl die Vorwärtsprimer (forward
primer) als auch die Umkehrprimer (reverse primer) sind, gemäß der IUPAC
Konventionen und bezogen auf den DNA-Strang, in 5'-3' Richtung
dargestellt. Der Grad der Degeneration, das heißt mit anderen Worten die
25 Anzahl der verschiedenen, bei der Synthese erhältlichen möglichen konkreten
Ausführungsformen dieser Primer, ist jeweils in Form der theoretisch
errechneten Anzahl verschiedener Oligonukleotide angegeben.

- 30 Tabelle 2: Immobilisierte synthetische retroviruspezifische Oligonukleotid-Sonden zur
Herstellung von Dot-Blot Membranen. Für jeden Fleck bzw. Dot wurde eine
Mischung aus äquimolaren Mengen der beiden Partner eines

Oligonukleotidpaares, das zu einem 90 bp langen Abschnitt einer retroviruspezifischen Reversen Transkriptase korrespondiert, hergestellt. Jeweils 100 Picomole dieser Mischungen wurden in der dem abgebildeten Code entsprechenden Anordnung auf die Membran aufgetragen. Zur internen Standardisierung der Hybridisierung und Autoradiographie wurde eine Verdünnungsreihe menschlicher genomischer DNA (8E - 8H) und von Oligonukleotid-Primer-Mischungen (8I - 8L) auf die Filter aufgebracht. Für jede auf dem Filter eingesetzte Oligonukleotidsequenz ist, soweit verfügbar, die Genbank- Zugriffsnummer und der Erstautor angegeben.

Tabelle 3: Klassifizierung von retroviruspezifischen Oligonukleotid-Dot-Blot-Sonden:

Von 61 repräsentativen Mitgliedern aller bekannten humanen exogenen und endogenen Retroviren wurde die Nukleotidsequenz des jeweiligen Reverse Transkriptase Gens in dem Bereich zwischen den hoch konservierten Domänen V L P Q G und Y M/V D D I/V/L L für die Synthese von Dot-Blot-Sonden herangezogen (Shih et al. 1989, Donehower et al. 1990). In dem hier dargestellten Experiment wurden 21 retrovirale Nukleotidsequenzen vom Typ ABD (HERV-K Superfamilie), 19 retrovirale Nukleotidsequenzen vom Typ C, 1 retrovirale Nukleotidsequenz vom Typ D und 7 Nukleotidsequenzen mit Verwandtschaft zum humanen Foamy Virus eingesetzt. Ferner wurde eine humane LINE-1 Sequenz (3L) und 6 exogene humane Retroviren (6E - 6J), sowie fünf Sonden, die zu je einem tierischen Säuger-C-Typ-Retrovirus korrespondieren und eine Sonde, die zu einem tierischen Säuger-B-Typ-Retrovirus korrespondiert (7E - 7J), getestet.

Sterne markieren mit HERV Transkripten verwandte Nukleotidsequenzen, die in Patienten mit Multipler Sklerose und Patienten mit systemischer Lupus-Erythematose gefunden wurden.

FIG. 1. Lokalisierung von konservierten Aminosäureabschnitten in der aminoterminalen Genregion der Reversen Transkriptase von Retroviren und Retrotransposons. Die Homologie Kernregionen V L P Q G und Y M/V D D

I/V/L L wurden für die Ableitung und Herstellung der degenerierten Oligonukleotide der erfindungsgemäßen Primermischungen (MOP-ABD bzw. MOP-C) eingesetzt.

5 FIG. 2. Schematische Darstellung des erfindungsgemäßen RT-PCR/RDBH Verfahrens.

FIG. 3. HERV Expressionsmuster in humanen PBMNCs eines gesunden Blutspenders.

10

Die Durchführung der Reversen Dot-Blot-Hybridisierung (RDBH) erfolgte unter Standardbedingungen mit DNA-Fragmenten, die mit den erfindungsgemäßen Primermischungen aus degenerierten Oligonukleotiden, nämlich MOP-ABD (Tabelle A) bzw. MOP-C (Tabelle B) bzw. der Kombination MOP-ABD/MOP-C (Tabelle C) amplifiziert worden waren.

15

FIG. 4. HERV Expression in humanen PBMNCs nach Zugabe eines klonierten DNA-Fragments, das ein PERV RT-Gen enthält. Weniger als 10 Kopien einer endogenen Schweineretrovirus (PERV) Typ A DNA (Patience et al. 1997) konnten unter standardisierten Versuchsbedingungen noch nachgewiesen und identifiziert werden (Tafel A, Filter Code 7F). Unter den angewendeten Stringenzbedingungen wurde keine Kreuzhybridisierung von HERVs mit schweinespezifischen Amplifikationsprodukten, die von einer Schweine-DNA-Matrize gewonnen wurden, beobachtet (Tafel B).

20

25

Beispiel 1: RNA Präparation

Von peripheren mononukleären Blutzellen (PBMNC = peripheral blood mononuclear cells) eines gesunden Blutspenders wurde die gesamt-RNA gemäß dem Guanidin
30 Isothiocyanate/Cäsium Chlorid (GIT/CsCl) Ultrazentrifugations-Protokoll von Sambrook et al. (1989) extrahiert und in mit Diethylpyrocarbonat (DEPC)-behandeltem

destillierten Wasser gelöst. Anschließend wurde die mRNA mit herkömmlichen Methoden angereichert, z.B. unter Verwendung des kommerziell erhältlichen Anreicherungskits 'Dynabeads™ paramagnetic Partikel' nach den Anweisungen des Herstellers (DynaL, Hamburg, Germany). Die Nukleinsäure-Konzentration wurde mittels Spektrophotometrie bei 260 nm bestimmt. Zur Überprüfung auf etwaige Kontaminationen mit genomischer DNA wurden 50 ng von jeder mRNA-Präparation direkt, d.h. ohne zunächst einer reversen Transkription unterworfen worden zu sein, in einer Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) unter Verwendung der erfindungsgemäßen Primermischungen aus degenerierten Oligonucleotiden (MOP) eingesetzt. Nur solche Präparationen, die keine DNA-Spuren aufwiesen, wurden für die eigentliche PCR verwendet. Diejenigen Präparationsansätze, bei denen eine DNA-Kontamination nachweisbar war, wurden so lange mit 100 Einheiten/µg RNase-freier DNase (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) in 100 mM Natrium-Azetat pH 5.0, 5 mM MgSO₄ behandelt, bis die Kontroll-PCR ein negatives Ergebnis lieferte.

15

Beispiel 2: Herstellung von erfindungsgemäßen Primermischungen MOP-ABD und MOP-C für die PCR.

In Tabelle 1 sind bevorzugte MOP-ABD und MOP-C-Primermischungen unter Verwendung der in Fachkreisen bekannten und geläufigen IUPAC-Nomenklatur dargestellt. Jede der Primermischungen enthält eine Mehrzahl verschiedener Vorwärtsprimer (forward primer) und Umkehrprimer (reverse primer): Die Vorwärtsprimer (forward primer) der Primermischung MOP-ABD weisen die allgemeine Nukleotidsequenz GAAGGATCCARAGTNYTDYCHCMRGGH auf, die 3456 Degenerationen, d.h. 3456 verschiedene konkrete Nukleotidsequenzen umfaßt. Die Umkehrprimer (reverse primer) der Primermischung MOP-ABD weisen die Nukleotidsequenz GAAGGATCCNWDDMKDTYATCMAYRWA auf, die 27648 Degenerationen, d.h. 27648 verschiedene konkrete Nukleotidsequenzen umfaßt. Die Vorwärtsprimer (forward primer) der Primermischung MOP-C sind durch die allgemeine Nukleotidsequenz GAAGGATCCTKKAMMSKVYTRCYHCARGGG gekennzeichnet, die 3072 Degenerationen, d.h. 3072 verschiedene konkrete Nukleotidsequenzen umfaßt,

und die Umkehrprimer (reverse primer) der Primermischung MOP-C weisen die Nukleotidsequenz GAAGGATCCMDVHDRBMDKYMAYVYAHKKA auf, die 8192 Degenerationen, d.h. 8192 verschiedene konkrete Nukleotidsequenzen umfaßt.

Diese Primer-Nukleotidsequenzen korrespondieren zu den hoch konservierten

- 5 Homologie Kernregionen V L P Q G und Y M/V D D I/V/L L innerhalb des Reverse Transkriptase (RT) Gens aller bekannten humanen endogenen und exogenen Retroviren (siehe Fig. 1 und die Publikationen von Xiong und Eickbush 1990, Shih et al. 1989 und Donehower et al. 1990). Der als "Kopf" bezeichnete Anfang der Primernukleotidsequenzen an dem 5' Ende der jeweiligen retroviruspezifischen Core-Homologie-Region, nämlich die Nukleotidfolge GAAGGATCC ist eine
- 10 Extensionssequenz, die aus der sogenannten "clamp"-Sequenz GAA und der *Bam*HI Restriktionsstelle GGATCC besteht.

Anstelle der hier beschriebenen "clamp"-Sequenz und der hier beschriebenen *Bam*HI Restriktionsstelle kann auch eine andere "clamp"-Sequenz und/oder eine andere

- 15 Schnittstelle für ein Restriktionsenzym zur Erzeugung der "Kopf" bzw. Extensionsequenz der jeweiligen Primer verwendet werden. Grundsätzlich gilt allerdings, daß die Länge dieser "Kopf" bzw. Extensionsequenz nicht mehr als die Hälfte der Primergesamtlänge betragen sollte.

- 20 Die Primermischung MOP-ABD erlaubt die separate Amplifikation der Retroviren vom Typ A, B und D, und die Primermischung MOP-C erlaubt die separate Amplifikation der Retroviren vom Typ C. Beide Primermischungen können ohne weiteres kombiniert werden und ermöglichen damit die Amplifikation aller Retrovirustypen (Typ A, B, C, und D).

25

Beispiel 3: Herstellung der Sonden für die Reverse Dot Blot Hybridisierung (RDBH)

Aminosäuresequenz-Vergleiche haben gezeigt, daß die für die Reverse Transkriptase

30 kodierenden Gene aller Retroviren und der meisten Retroelemente hoch konservierte Homologie Kernregionen aufweisen (Poch et al. 1989, Shih et al. 1989, McClure 1993,

Donehower et al. 1990, Xiong and Eickbush 1990). Zwei der meist konservierten Aminosäuresequenzabschnitte sind die Aminosäuremotive V L P Q G und Y V/M D D I/V/L L (Fig. 1). Der Sequenzbereich zwischen diesen Motiven umfaßt etwa 90 Basenpaare (d.h. ist etwa 90 bp lang) und weist eine deutlich geringere Homologie innerhalb der verschiedenen Retrovirus-Familien auf. Dieser Bereich wurde zur Herstellung von retrovirusspezifischen Sonden für die RDBH herangezogen. Dabei wurde wie folgt vorgegangen: zunächst wurden allgemein zugängliche Nukleotidsequenz-Datenbanken nach Nukleotidsequenz durchsucht, die mit der Nukleotidsequenz der Reversen Transkriptase (RT) verwandt sind. Sequenzen von exogenen und endogenen Retroviren wurden gemäß der geltenden Nomenklatur klassifiziert und hinsichtlich ihrer RT-Homologie weiter in Unterklassen untergliedert (Daten hier nicht dargestellt). Einige bisher unpublizierte HERV-Sequenzdaten wurden freundlicherweise von Martin Herrmann (1998) zur Verfügung gestellt, einige wurden selbst charakterisiert. Von allen bekannten Retrovirus-Familien wurden repräsentative Mitglieder ausgewählt (Tab. 3) und aus deren jeweiligem RT-Gen, jeweils im Bereich zwischen den hoch konservierten RT-Motiven V L P Q G und Y M/V D D I/V/L L, jeweils ein ca. 90 bp langes Fragment isoliert und als Vorlage zur Synthese entsprechender RDBH-Sonden verwendet. Da die Effizienz einer Oligonukleotid-Synthese mit der Länge des zu synthetisierenden Oligonukleotids abnimmt, wurden jeweils anstelle eines 90 pb langen Oligonukleotids (90-mer) zwei 45 bp lange Oligonukleotide (45-mers) synthetisiert und als Paar eingesetzt. Jeder Dot (Fleck) des auf die hier beschriebene Weise hergestellten Dot-Blots entspricht einer äquimolaren Mischung aus gleichen Anteilen eines Paares von 45mers aus der Gruppe der Paare, die in Tabelle 2 aufgelistet sind.

25

Beispiel 4: Herstellung von Reverse-Dot-Blot-Membranen für die RDBH

Retrovirus-spezifische Oligonukleotide, die zu einem 90 bp langen Fragment der hoch konservierten Domäne des RT-Gens korrespondieren, wurden synthetisiert und mittels HPLC gereinigt. Für jede zu testende retrovirale Nukleotidsequenz wurden äquimolare Mengen der beiden Partner eines gemäß Beispiel 3 hergestellten Paares von 45-mer

Oligonucleotiden zusammengemischt und 100 Picomole dieser Paarmischung wurden in 5x SSC (1x SSC = 0,15M NaCl plus 0,015 M Natriumcitrat) gelöst und anschließend manuell oder maschinell, mit Hilfe einer handelsüblichen Dot Blot Apparatur (beispielsweise Minifold I dot blotter SRC96D von Schleicher & Schuell, Dassel Germany), auf eine handelsübliche Filtermembran (beispielsweise eine ZETApröbe™ GT blotting Membran von BioRad, Hercules CA USA) aufgetropft. Die Filter wurden in 2x SSC äquiliert, die Oligonucleotide wurden irreversibel immobilisiert, vorzugsweise mittels UV-Crosslinking (beispielsweise mit dem kommerziell erhältlichen UV-Strahler Stratalinker™ von Stratagene, La Jolla, CA USA), und die Filter wurden anschließend an der Luft getrocknet.

Nach erfolgter Hybridisierung der Amplifikat-DNA an die kovalent auf den Membranen gebundenen RDBH-Sonden kann gebundene Amplifikat-DNA von der Dot-Blot Membran durch alkalische Denaturierung wieder gelöst werden und bei Bedarf reamplifiziert werden, um ausreichende Mengen an doppelsträngiger DNA z.B. für eine Klonierung und nachfolgende Sequenzanalyse der betreffenden Amplifikate zu erhalten.

Beispiel 5: Reverse Transkription und Polymerase –Ketten-Reaktion (RT-PCR)

Von jedem Versuchsansatz wurden 500 ng DNA-freie mRNA in 50 µl einer Lösung aus 20 mM Tris/HCl pH 8,4, 10 mM Dithiothreitol (DTT), 50 mM KCl, 2,5 mM MgCl₂, 0,5 mM von jedem Desoxynukleosidtriphosphat (dNTP), 10 Einheiten RNasin (Promega) 30 pmol Random Hexamere Oligonucleotides (Promega) und 20 Einheiten an MLV Reverse Transkriptase (GIBCO-BRL) bei 37 °C für 1 Stunde revers transkribiert. Anschließend wurden die Ansätze denaturiert, beispielsweise durch Hitzebehandlung bei 95°C für 5 Min., und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Für die erfindungsgemäßen MOP-PCRs (mit MOP-ABD und/oder MOP-C) wurde jeweils ein Zwanzigstel Volumen (1/20) der cDNA-Reaktion in 50 µl einer Lösung aus 10 mM Tris/HCl pH 8,3, 50 mM KCl, 2,5 mM MgCl₂, 0,001% Gelatine, 50 pmoles der betreffenden erfindungsgemäßen Primermischung(en) aus degenerierten Oligonucleotiden, 0,25 mM von jedem Desoxynukleosidtriphosphat, und 1,25 Einheiten Taq Polymerase (GIBCO-BRL) amplifiziert. Die Versuchsansätze wurde auf Eis

zubereitet und mit 50 µl Mineralöl (Sigma) überschichtet. Die Amplifikation wurde in einem handelsüblichen DNA-Thermal-Zykler (beispielsweise der Firma Perkin Elmer Cetus) unter Verwendung der fachbekannten "Hot-Start"-Methode durchgeführt, wobei 30 Zyklen durchlaufen wurden, die jeweils die folgenden Parameter aufwiesen: 30 Sek. bei 94 °C, 4 Min. bei 50 °C und 1 Min. bei 72 °C. Zum Abschluß wurde ein Extensionsschritt bei 72°C für 7 Min. durchgeführt. Die Annealingzeit, d.h. die Zeit zur Doppelstrangbildung, betrug vier Minuten, um zu gewährleisten, daß die überwiegende Zahl der in der erfindungsgemäßen Primermischung enthaltenen (degenerierten Oligonukleotid-) Primer die zu ihnen homologen Matrizen finden. Die Extensionssequenz der erfindungsgemäßen Primer hat einen stabilisierenden Effekt auf die Primer-Matrizen-Bindungskinetik, so daß die in dem ersten PCR-Zyklus gebildeten PCR-Produkte in den folgenden Zyklen wesentlich effizienter amplifiziert werden. Damit geht der Vorteil einher, daß retrovirale Matrizen selbst dann amplifiziert werden (können), wenn der exakt dazu passende Primer nicht in der erfindungsgemäßen Primermischung vorhanden ist. Darüber hinaus ist eine schnelle Klonierung der Amplifikationsprodukte z.B. für eine Sequenzüberprüfung oder für die Charakterisierung neuer RT-verwandter Nukleotidsequenzen möglich.

Die Reaktionsbedingungen für die PCR wurden im Hinblick auf die Primermenge, die Annealingzeit (Doppelstrangbildungszeit) und die Annealingtemperatur (Doppelstrangbildungstemperatur) optimiert, um eine optimale Produktausbeute zu erzielen..

Um Produkt-Kontaminationen aus vorangegangenen PCR-Experimenten und etwaige Spuren von genomischen DNA-Kontaminationen in den verwendeten Lösungen nachzuweisen, wurde eine Kontrollreaktion durchgeführt, bei der die Matrizen weggelassen wurden. Die Amplifikationsprodukte wurden auf präparativen 2.5 % TBE Agarose Gelen elektrophoretisch aufgetrennt und mit Ethydiumbromid angefärbt. Banden mit einer Größe zwischen 100 und 150 bp, die mit den amplifizierten retroviralen RT-Nukleotidsequenzen korrespondierten, wurden aus dem Gel ausgeschnitten und unter Verwendung eines handelsüblichen Reinigungssets (beispielsweise des GENE CLEAN II kits von BIO 101 Inc., Vista CA USA) aufgereinigt. Für die RDBH wurden ca. 50 ng der gereinigten Fragmente mit [α-

³²P]dATP (3000 Ci/mmol) markiert. Die Markierung wurde mittels des Megaprime DNA labelling kit (Amersham Pharmacia Biotech, England) durchgeführt, sie kann aber selbstverständlich ebenso gut auch mit Hilfe anderer gebräuchlicher Markierungsverfahren erfolgen.

5

Beispiel 6: Reverse Dot Blot Hybridisierung (RDBH)

Sowohl für den Nachweis als auch für die Identifikation der amplifizierten Produkte wurde die Methode der RDBH angewendet. Diese RDBH-Methode ermöglicht eine strikte Diskriminierung (Unterscheidung) von PCR-Produkten, so daß gegebenenfalls vorhandene falsch amplifizierte Nukleotidsequenzen, die keine Verwandtschaft zu Nukleotidsequenzen von retroviralen RT-Genen aufweisen, ohne Bedeutung sind. Die hohe Stringenz der RDBH wird durch den Einsatz der erfindungsgemäßen synthetischen HERV-spezifischen Oligonukleotide erreicht, die als RDBH-Sonden auf die Dot Blot Filtermembran aufgebracht sind. Der erfindungswesentliche Vorteil dieser RDBH-Sonden- Oligonukleotide besteht darin, daß sie keine der Nukleotidsequenzen enthalten, die die degenerierten Oligonukleotide der erfindungsgemäßen PCR-Primermischungen MOP-ABD und MOP-C aufweisen (vgl. z.B. Tab. 1) und sich dadurch grundsätzlich von diesen PCR-Primer-Oligonukleotiden unterscheiden. Dieser grundsätzliche Unterschied zwischen den RDBH-Sonden-Oligonukleotiden und den PCR-Primer-Oligonukleotiden gewährleistet, daß eine Hybridisierung zwischen einer RDBH-Sonde und einem PCR-Amplifikat nur dann stattfindet, wenn die zwischen den beiden Primern befindliche Nukleotidsequenz mit dem betreffenden RDBH-Sonden-Oligonukleotid korrespondiert, d.h. wenn diese Nukleotidsequenz mit dem betreffenden RT-Nukleotidsequenzabschnitt identisch ist oder sich nur in wenigen Nukleotiden (n=3) unterscheidet. Im Idealfall sollten die hybridisierenden DNA-Sequenzen völlig identisch sein. In der Praxis unter den gegebenen Hybridisierungsbedingungen sind Unterschiede von zwei bis drei Nukleotiden tolerierbar. Infolgedessen können unter hoch stringenten Bedingungen selbst eng verwandte retrovirale Nukleotidsequenz noch voneinander unterschieden und eindeutig identifiziert werden.

Zur Vermeidung von Kreuz-Hybridisierungen wurden die optimalen Stringenzbedingungen für die RDBH bestimmt, indem Hybridisierungstemperatur, Waschtemperatur und Salzkonzentrationen variiert wurden. Die Prähybridisierung der Reverse-D-Blot-Filters wurde in verschweißten Plastiktaschen in 0,25 M Na_2HPO_4 pH 7,2, 7% Natriumdodecylsulfate (SDS), 1 mM EDTA bei 50 °C für mindestens 3 Std. durchgeführt. Für die eigentliche Hybridisierung wurden dieselben Lösungen mit 5×10^5 CpM der markierten PCR-Amplifikate pro ml Hybridisierungsvolumen versetzt und für 16 Std. unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Anschließend wurden die Membranen zweimal in 40 mM Na_2HPO_4 , pH 7,2, 5% SDS, 1 mM EDTA und zweimal in 40 mM Na_2HPO_4 , pH 7,2, 1% SDS, 1 mM EDTA, (jeweils ca 30 Min.) gewaschen. Die Untersuchung und Auswertung der Reaktion erfolgte mittels Autoradiographie.

Beispiel 7: Analyse des HERV-Transkriptionsmusters in humanen PBMNCs mittels des erfindungsgemäßen PCR/RDBH-Verfahrens

Gemäß dem in Fig. 2 dargestellten Verfahrensschema wurde zunächst aus humanen PBMNCs die Gesamt-RNA wie in Beispiel 1 beschrieben mittel gängiger Isolationstechniken extrahiert. Diese Gesamt-RNA wurde zunächst einer RT-PCR/RDBH unter Verwendung der erfindungsgemäßen Primermischung MOP-ABD unterworfen. Dabei wurden nahezu ausschließlich Typ B-verwandte HERVs, d.h. Mitglieder der HERV-K Überfamilie, nachgewiesen (Fig. 3A). Die meisten Transkripte stammten von Mitgliedern der HERV-K -Untergruppen HML-2, -3, -4, und -6. Darüber hinaus wurden Signale von HERV-KC4 verwandten Elementen (8A, 8B) und von einer weiteren HERV-K verwandten Nukleotidsequenz, die keiner der HML-Untergruppen zugeordnet werden konnte (5F), gefunden. Das beobachtete Expressionsmuster steht in Übereinstimmung mit bereits publizierten Studien, die im Ergebnis eine differenzierte Expression von HML-Elementen in humanen Geweben feststellten (Medstrand et al. 1993, Andersson et al. 1996). Außerdem wurden geringe Mengen des mit dem humanen Foamy Virus verwandten Elements HERV-L gefunden, womit die hohe Spezifität der MOP-ABD Primermischung für Typ- ABD-verwandte Elemente gezeigt ist.

25

Parallel zu diesem Versuch wurde die Gesamt-RNA von PBMNCs einer RT-PCR/RDBH unter Verwendung der erfindungsgemäßen Primermischung MOP-C unterworfen. Im Unterschied zur MOB-ABD-Primermischung ist die MOP-C-Primermischung nicht nur zum Priming von Typ- C-verwandten Nukleotidsequenz
5 geeignet, sondern amplifiziert auch HERV-K-verwandte Elemente der HML-2, HML-4, und HML-6 Untergruppen. Es war eine starke Expression von HERV-E4-1-verwandten Elementen (2H und 2I), von humanem Foamy Virus verwandten HERV-L Elementen (1E bis 1K) und von ERV9-verwandten HERVs (4E bis 4G, und 4I) nachweisbar. Obwohl in allen RDBH-Reaktionen die gleichen Mengen an radioaktiv markierten PCR-Amplifikaten eingesetzt wurden, ergaben die auf den Membranen vorhandenen
10 genomischen DNA-Sonden (8E bis 8H) nach der Hybridisierung mit MOP-C erzeugten PCR-Amplifikaten wesentlich stärkere Signale als nach der Hybridisierung mit MOP-ABD erzeugten PCR-Amplifikaten. Diese Befunde weisen darauf hin, daß das humane Genom signifikant mehr Kopien von Typ C-verwandten HERV-Elementen als von Typ-
15 B-verwandten HERV Elementen enthält.

Zum Nachweis aller retroviralen Nukleotidsequenzen in einem einzigen Experiment wurden die MOP-ABD- und die MOP-C-Primermischungen in Kombination aus äquimolaren Mengen in einem erfindungsgemäßen PCR/RDBH-Verfahren eingesetzt.
20 Dieses Experiment resultierte in einer überwiegenden Amplifikation von Typ C-verwandten Nukleotidsequenzen, während die ABD-Typ-Sequenzen unterrepräsentiert blieben (Daten hier nicht dargestellt). Aus diesem Grund wurden separate PCR Verfahren mit MOP-ABD-Primermischungen einerseits und MOP-C-Primermischungen andererseits durchgeführt und die gereinigten Amplifikationsprodukte beider Verfahren
25 in äquimolaren Mengen kombiniert. Mit dieser Amplifikationsproduktkombination wurde dann die RDBH durchgeführt. Dabei wurde das in Fig. 3C dargestellte Signalmuster erhalten, das der theoretischen Kombination der Signalmuster der RDBH-Verfahren mit MOP-ABD- Amplifikaten gemäß Fig. 3A einerseits und mit MOP-C-Amplifikaten gemäß Fig. 3B andererseits entspricht. Dieser Befund zeigt, daß das erfindungsgemäße
30 PCR/RDBH-Verfahren insbesondere als qualitatives Nachweisverfahren überragend gut geeignet ist.

Beispiel 8: Nachweis der Sensitivität des erfindungsgemäßen PCR/RDBH-Verfahrens

Zur Überprüfung der Sensitivität des erfindungsgemäßen PCR/RDBH-Verfahrens im Hinblick auf einen angestrebten praktischen Einsatz in der Routinediagnostik, z.B. zum Nachweis bzw. Ausschluß einer etwaigen Interspezies-Transmission von PERV mit Xenotransplantaten, wurden Verdünnungsreihenexperimente unter Verwendung von cDNA aus humanen PBMNCs und abnehmenden Konzentrationen eines klonierten DNA-Fragments, das eine PERV RT -kodierende Region enthält (Takeuchi et al. 1998), durchgeführt. Unter standardisierten Versuchsbedingungen war in der cDNA, die aus 25 ng humaner PBMNC mRNA gewonnenen worden war, selbst noch die so geringe Menge von 10 Kopien PERV DNA nachweisbar (siehe FIG. 4A, Filter Code 7F).

Irgendwelche Kreuzhybridisierungen zwischen humanspezifischen Amplifikaten und PERV-spezifischen RDBH-Sonden wurden nicht beobachtet (vgl. Fig. 3C, Filter Code 7F). Auch bei der Durchführung des PCR/RDBH-Verfahrens mit reiner Schweine-DNA als PCR Matrize (FIG. 4B) waren keine Kreuzhybridisierungen zwischen den Schweine-Amplifikaten und den humanen endogenen oder exogenen retroviralen Nukleotidsequenzen nachweisbar. Diese Ergebnisse sind ein starkes Indiz für die sehr hohe Interspezies-Spezifität des erfindungsgemäßen PCR/RDBH-Verfahrens.

Die in dem hier dargestellten Versuch gewonnenen Ergebnisse, nämlich das mit der murinen Typ-C Retrovirus-spezifischen Sonde (7 I) erhaltene schwache Signal, weisen überraschenderweise darauf hin, daß in der Schweine-Genom-DNA ebenfalls PERVs mit einer Homology zu MoMuLV enthalten sind. Weitere Ergebnisse dieses Versuchs, nämlich die Beobachtung eines schwachen Signals mit humanen DNA-Sonden (8E, 8F) weisen ebenfalls überraschend darauf hin, daß auch das humane Genom möglicherweise PERV verwandte Nukleotidsequenzen enthält, die kein Pendant auf der eingesetzten Dot Blot Membran haben und infolgedessen vermutlich bisher noch uncharakterisiert sind. Dieser Befunde verdeutlichen den außerordentlichen Vorteil des erfindungsgemäßen PCR/RDBH-Verfahrens, nämlich die Ermöglichung des Auffindens, der Isolierung und Klonierung von bisher unbekannten DNA -Fragmenten.

Ansprüche

1. Verfahren zum spezifischen Nachweis und zur Identifizierung retroviraler Nukleinsäuren / Retroviren in einem Untersuchungsgut, gekennzeichnet durch Art und Reihenfolge der nachstehend genannten Maßnahmen:
 - Isolierung der Nukleinsäuren, nämlich DNS- und/oder RNS, aus dem Untersuchungsgut,
 - Durchführung einer PCR mit den isolierten DNS oder einer RT-PCR mit den isolierten von RNS unter Verwendung von einer oder beiden der nachfolgend dargestellten, jeweils aus Vorwärtsprimern (forward primer) und Umkehrprimern (reverse primer) bestehenden Primermischungen MOP-ABD und MOP-C, deren Vorwärtsprimer und Umkehrprimer degenerierte Oligonukleotide mit den in den Sequenzprotokollen SEQ ID NO. 1 bis NO. 4 gemäß der IUPAC-Nomenklatur wiedergegebenen Nukleotidsequenzen sind, wobei
die Vorwärtsprimer der Mischung MOP-ABD die Nukleotidsequenzen gemäß SEQ ID NO. 1, nämlich: "Kopf"-ARAGTNYTDYCHCMRGGH, mit 3456 Degenerationen aufweisen,
die Umkehrprimer der Mischung MOP-ABD die Nukleotidsequenzen gemäß SEQ ID NO. 2, nämlich: "Kopf"-NWDDMKDITYATCMAYRWA, mit 27648 Degenerationen aufweisen,
die Vorwärtsprimer der Mischung MOP-C die Nukleotidsequenzen gemäß SEQ ID NO. 3, nämlich: "Kopf"-TKKAMMSKVYTRCYHCARGGG, mit 3072 Degenerationen aufweisen, und
die Umkehrprimer der Mischung MOP-C die Nukleotidsequenzen gemäß SEQ ID NO. 4, nämlich: "Kopf"-MDVHDRBMDKYMAYVYAHKKA, mit 8192 Degenerationen aufweisen,
wobei "Kopf" für eine Nukleotidsequenz steht, die eine Schnittstelle für ein Restriktionsenzym und eine sog. Klammer (clamp)-Sequenz am 5'-Ende dieser Schnittstelle umfaßt,
 - Aufreinigung der erhaltenen (RT-) PCR-Amplifikate und Einsatz derselben in einem RDBH-Verfahren unter Verwendung immobilisierter RDBH-Sonden, die

jeweils (je Sonde) synthetische Oligonukleotide umfassen, deren Nukleotidsequenz der retroviralen Nukleotidsequenz des retroviruspezifischen Reverse-Transkriptase-Gens der mit dem betreffenden Dot nachzuweisenden Virusart oder einem Abschnitt einer solchen reviralen Nukleotidsequenz entspricht und keine Überlappung mit den Nukleotidsequenzen der in der PCR oder RT-PCR eingesetzten Vorwärtsprimern (forward primer) und Umkehrprimern (reverse primer) aufweist.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, das der "Kopf"-Abschnitt der in den Sequenzprotokollen dargestellten Nukleotidsequenzen die Nukleotidsequenz GAAGGATCC aufweist.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet daß die Nukleotidsequenzen der synthetischen Oligonukleotide der RDBH-Sonden zu der retroviralen Nukleinsäureregion des Reverse-Transkriptase-Gens zwischen den hoch konservierten Motiven V L P Q G und Y M/V D D I/V/L L oder zu einem Abschnitt dieser Region korrespondieren.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß als immobilisierte RDBH-Sonden jeweils (je Sonden bzw. je Dot) eine Mischung aus äquimolaren Mengen der beiden Partner eines Paares synthetischer Oligonukleotide, das zusammen (als Paar) zu einem vorzugsweise 90 bp langen Abschnitt aus der Nukleinsäureregion des Reverse-Transkriptase-Gens zwischen den hoch konservierten Motiven V L P Q G und Y M/V D D I/V/L L korrespondiert, eingesetzt wird.
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die beiden Partner des Paares synthetischer Oligonukleotide annähernd gleich groß bzw. gleich lang, vorzugsweise ca 45 bp lang sind.
6. Aus Vorwärtsprimern (forward primer) und Umkehrprimern (reverse primer) bestehende Primermischung für die PCR, deren Vorwärtsprimer und Umkehrprimer

degenerierte Oligonukleotide mit den in den Sequenzprotokollen SEQ ID NO. 1 und SEQ ID NO. 2 gemäß der IUPAC-Nomenklatur wiedergegebenen Nukleotidsequenzen sind, wobei die Vorwärtsprimer die Nukleotidsequenz SEQ ID NO. 1, nämlich: "Kopf"-ARAGTNYTDYCHCMRGGH, mit 3456 Degenerationen und die Umkehrprimer die Nukleotidsequenzen gemäß SEQ ID NO. 2, nämlich: "Kopf"-NWDDMKDITYATCMAYRWA, mit 27648 Degenerationen aufweisen, und wobei "Kopf" für eine Nukleotidsequenz steht, die eine Schnittstelle für ein Restriktionsenzym und eine sog. Klammer (clamp)-Sequenz am 5'-Ende dieser Schnittstelle umfaßt und vorzugsweise die Nukleotidsequenz GAAGGATCC aufweist.

7. Aus Vorwärtsprimern (forward primer) und Umkehrprimern (reverse primer) bestehende Primermischung für die PCR, deren Vorwärtsprimer und degenerierte Oligonukleotide mit den in den Sequenzprotokollen SEQ ID NO. 3 und SEQ ID NO. 4 gemäß der IUPAC-Nomenklatur wiedergegebenen Nukleotidsequenzen sind, wobei die Vorwärtsprimer die Nukleotidsequenz SEQ ID NO. 3, nämlich: "Kopf"-TKKAMMSKVYTRCYHCARGGG, mit 3072 Degenerationen, und die Nukleotidsequenzen gemäß SEQ ID NO. 4, nämlich: "Kopf"-MDVHDBMDKYMAYVYAHKKA, mit 8192 Degenerationen aufweisen, und wobei "Kopf" für eine Nukleotidsequenz steht, die eine Schnittstelle für ein Restriktionsenzym und eine sog. Klammer (clamp)-Sequenz am 5'-Ende dieser Schnittstelle umfaßt Nukleotidsequenz GAAGGATCC aufweist.
8. Reverse-Dot-Blot-Hybridisierungs-Sonde, bestehend aus einem oder mehreren synthetischen Oligonukleotiden, dessen/deren Nukleotidsequenz(en) mit der Nukleinsäureregion eines retroviruspezifischen Reverse-Transkriptase-Gens zwischen den hoch konservierten Motiven V L P Q G und Y M/V D D I/V/L L oder mit einem Abschnitt dieser Nukleinsäureregion korrespondiert/korrespondieren.

9. Reverse-Dot-Blot-Hybridisierungs-Sonde nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Sonde aus äquimolaren Mengen zweier synthetischer Oligonukleotide besteht, die zusammen, hintereinandergereiht zu einem vorzugsweise 90 bp langen Abschnitt aus der Nukleinsäureregion des Reverse-Transkriptase-Gens zwischen den hoch konservierten Motiven V L P Q G und Y M/V D D I/V/L L korrespondieren.
10. Diagnosekit zum spezifischen Nachweis und zur Identifizierung retroviraler Nukleinsäuren / Retroviren in einem beliebigen Untersuchungsgut, umfassend wenigstens eine der aus Vorwärtsprimern (forward primer) und Umkehrprimern (reverse primer) bestehenden Primermischungen für die PCR gemäß Anspruch 6 und/oder Anspruch 7 und wenigstens eine Reverse-Dot-Blot-Hybridisierungs-Sonde gemäß Anspruch 8 oder Anspruch 9.

Tabelle 1

Primer		Nukleotidsequenz	Degeneration
MOP-ABD	Vorwärts-	<u>GAAGGATCC</u> ARAGTNYTDYCHCMRGGH	3456
	Umkehr-	<u>GAAGGATCC</u> NWDDMKDTYATCMAYRWA	27648
MOP-C	Vorwärts-	<u>GAAGGATCCT</u> KKAMMSKVYTRCYHCARGGG	3072
	Umkehr-	<u>GAAGGATCC</u> MDVHDRBMDKYMAYVYAHKKA	8192

Tabelle 2

Code	Quelle	Sonde	Oligonukleotidsequenz (5' → 3')
1A	U35102, Medstrand et al. 1993	HML-1	ATGCTAAATAGCCCAACTGTTGTTAAACTTATGTCAGAAAAGCTA ATGTTAAATAGCCCAACTATTTGTCAAACCTATGTTGGGAAAGTT
1B	S77579, Levebvre et al. 1995	SEQ29	ATGTTAAATAGCCCAACTATTTGTCAAACCTATGTTGGGAAAGTT ATTAAGCCAGTTAGAGAACAGTTTAAAAAATGTTATAGTATTCAT
1E	G895836, Cordonnier et al. 1995	HERV-L	TATATCAACTCTCCGGCTTTGTCATCAATCTTATTCAGAGTGAT CTTGATCACTTTTCACTGCCCAAGATATCACACTGGTCCATTAC
1F	Herrmann 1998	SEQ39	GTATATCAACTCTCCAGCTTTGTCATCAATCTTATTCAGAGTAT CCTTGATCACTTTTCACTTCCCAAGATATCATGCTGGTCCATTA
1G	Herrmann 1998	SEQ40	TTAATCAACTCTCTAGCTTTGATCATATAATCTTATTCGGAGAGAC CCTGATCGCTTTTCCGCTTCCGCAAGATATCACACTGGGTTGTTA
1H	Herrmann 1998	SEQ45	TATATCACTTATCTGGCTTTGTCAGCTAATCTTATTTGGAGAGAT CTAGATAACTTTTCACTTCCCAAGATATCACACTGGTCCACTAC
1I	Herrmann 1998	SEQ48	TATATCAACTCTCCAGCTTTGTCATATAATCTTATTCAGAGATC TTGATCACTTTTGGCTTCCACAAGATATCACACTGATTCGCTACA
1J	Herrmann 1998	SEQ51	TGTATCAACTCTCTGGCTTTGTCATATAATCTTATTCAGAGATC CTTGATCGCTTTTGGCTTCCACNAGATATCACACTGGTCCATTAT
1K	Herrmann 1998	SEQ58	TATATCAACTCTCCAGCTTTTGGCTTCCATAAGACATCACACTGGCCATTAC CTTGATCACTTTTGGCTTCCATAAGACATCACACTGGTCCATTAT
2A	M14123 Ono et al. 1986	HERV-K10	ATGCTTAATAGTCCAACTATTTGTCAGACTTTTGTAGTTCGAGCT CTTCAACCAGTGAGAGAAAAGTTTTCAGACTGTTATATATTCAT
2B	U87592 Zsiros et al. 1998	SEQ U87592	ATGCTTAATAGTCCAACTATTTGTCAGACTTTTGTAGTTCGAGCT CTTCAACCAGTTAGAGAAAAGTTTTCAGACTGTTATATATTCAT
2E	U12970 Hallmeier et al. 1995	pCRTK1	TTTAAAACTCCCTACCCCTTTTGGGGAAGCCCTCCCAACAGGAT CTTATACCATCTGAGCCAGTAACCCCTCACTGCACTCTTCTCCAG
2F	U12969 Hallmeier et al. 1995	pCRTK6	TTTAAAACTCCCTACCCCTTTTGGGGAAGCCCTCCCAACAGGAT CTTCAACCAGTTAGAGCCAGTCCCTTAACCTGTAACCTCTTCTCA
2H	M10976 Repaske et al. 1985	HERVE41	TTCAAGAACTCCCAACCATCTTTGGGGAAGCCCTCCCAACAGGAT CCTCCAGAAAGTTTCCCAACCAAGACCTAGGCTGCGTGTGCTCC
2I	Herrmann 1998	SEQ32	TTCAAGAACTCCCTACCTATCTTCGGGAGGCTCTGACTTGAGAC TTGCAAAAGTTTCTGCTAAAGACCTAGGCTATGCTTGCTCCTG
2J	AF026252, Lindeskog et al. 1998	HERV-H	TTCAAGAACTCCCAACCATCTTCACTCAAGCCCAATTTCTTCC TTATCTGTTACCTATCTCCGCAATATCTCATATAAACAACACAGTG
2K	Herrmann 1998	SEQ61	TTCAAGAACTCCCAACCATCTTCACTCAAGCTCTTCTCTCATGAT CTACTTCTTCCATCCATCTGTTTCTCACTTATTCATATAC

2L	Herrmann 1998	SEQ66	TTTCAGACAGCGCCCACTTACTTTAGTCAAGCTCTTTCTCATGAT CTACTTTCTTCCATCCATCTGTTCTCACCTTATCAATATATG
3A	U35236, Medstrand et al. 1993	HML-3	ATGTTAAACAGTCCCAACAATTTGCCAGACTTATATGGGCAAGCAA TTGAACCTACTCTTAAATAATTTTCACAGTGTACATTAATTCATT
3B	S6676, Kalden und Herrmann, 1993	HERV1 SLE	ATGATAAACAGTCCCAACAATTTGCCAGGCATATGTAGGGCAAAC AAWTGAACCTACTGTGTAATAAATTTTCAGTGTACATTAATTCATT
3C	S77583 Lefebvre et al. 1995	RT244	ATGTTAAACAGTCCCAACAATTTGCCAGTCTATGTGGGCCAAGCA ATTGAACCTACTCTTAAATAATTTTCACAGTGTACATTAATTCAC
3D	Herrmann 1998	SEQ26	CGTGTAAACAGTCCGACTATTTGCCAGAAGTATGTGGGGCAAG CAATGAACTACTCGTAAATAAATTTTCACAGTGTACATTAATTC
3E	U27240 Seifarth et al. 1995	ERV-FRD	TTTCAGAGATAGTCCCAATTTGTTGGCAAGCCTTGGCTACATAT TTTCAGAGATAGTCCCAATTTGTTGGCAAGCCTTGGCTACATAT
3F	Herrmann 1998	SEQ46	TTTCAGAGATAGTCCCAATTTGTTGGCAAGCCTTGGCTACATAT TGCAGGACCTAAAGTCTTATATGGAGGGCAATCTCTCTACAG
3H	M92067 Maeda and Kim 1990	HERV-I	TTTCATGGATTACCCCAACCTTTTGGTCAAAATTTAGAACAAAGTGTAG CTAGACAAAGTCTTCTGTTCCAAACAATATGCTGCTTCAATAT
3I	U27241 Seifarth et al. 1995	HERV-IP (T47D)	TTTCAGAGACTCCCTAATATTTTGGTGAATTTTGAACAAGC ATTAGAAAAGTCTTCAATTCAGAACAAATATGCTTCTCCAG
3J	Herrmann 1998	SEQ65	AGACTCCCCTAATCTTTTGGCCAAATTTTGAACAAGTGTAG AAAAAGTGTCATCCCAAGCAATATGCTTGGCTACATATG
3L	McMillan and Singer 1993, M80343	LINE-I	TGCCCTCTCTCACCACTCTTATTCACATATGTTGGAAGTCTTG GCCAGGGCAATAGGAGGAGGAAGAAATTAAGGGTATTCATTA
4A	Herrmann 1998	SEQ34	ATGTTAAATGGTCCCAACAATTTGCCAGACATATGTGGGCAAGCA CTTGAACTACTCAFAAAAAATTTTTCAGTGTACATTAATTCAC
4B	Herrmann 1998	SEQ42	ATGTTAACTGTCCCAACAATTTGTCAGACTTATGTAGAACAAAGCA ATTGAACCTACTCATAAAAAATTTTTCAGTGTATATTAATTCATTA
4C	Herrmann 1998	SEQ43	ATGTTAAACAGTCCCAACAATTTGCCAGATGTAGGTGGTCAAGC AATTGAACCTACTGTGTAATAAATTTTGGTGTACATTTTCNTTA
4E	X57147, La Mantia et al. 1991	ERV9	TTTAGGATAGCCCTCATCTGTTGGTCAAGGCACTCTGGTCCCTCAA GATCTAGGCCACTTCTCAAGTCCAGGCACTCTGGTCCCTCAA
4F	Herrmann 1998	SEQ49	TTTCAGGGATATAGCCCCCATCTATTTGGTCAGGCATTAGCCAAAGA CTTGAGCCAGTCTCTACCTGGACACTCTGGTCCCTTGGTATA
4G	Herrmann 1998	SEQ59	TTTAGGATAGCCCTCATCTGTTGGTCAAGGCACTCTGGTGGTTCAGTAC ATCTAGTTCACCTCTCAAGTCCAGGCACTCTGGTGGTTCAGTAC
4H	Herrmann 1998	SEQ60	TTTAGGACAGCCCTCCTCATTTTCGGTCAGGCACCTTCAATTAG ACCTCTCCAGCTACATCTNCCYNGCATCTTGTCTCAGTA
4I	Herrmann 1998	SEQ63	TTTCAGGATAGTCCCATCTATTTGGCCAGGCATTAACCCGAG ACTTAAGCCAGTCTCATACGTGGACACTCTTGTCTTGGTA

4J	Herrmann 1998	SEQ64	TTTAGAGATAGCCCTCACCTGTTTGGCAAGCAATTGGCCAAGA TTTAAAGTCACTTCTTGACCCAGGTACCTTAATCTTCAATAT
4L	AF009668 Blond et al. 1999	HERV-W	TTTCAAGGATAGCCCCCATCTATTATTTGGCAGGCAATAGCCCAAG ACTTGAGTCAATTTCTATACCTGGACACTCTTGTCTCTTCACTAC
5A	AF020092 Seifarth et al. 1995	HERV-K (T47D)	CATGCTTAATAGTCCCACTATTTGTGAGTATTTTGTGGGCGTGT GCTTCAACCTGTGAGGATCAGTTTCCCCGATGTTACATCGTTCA
5B	Herrmann 1998	SEQ05	ATGCTTAATAGTCCCACTATTTGTGAGTATTTTGTGGGCGTGTG CTTCAACCTGTGAGGATCAGTTTCCCCGATGTTACATCGTTTAC
5C	Herrmann 1998	SEQ10	ATGCTTAATAGTCCCACTATTTGTGAGTATTTTGTGGGCGTGTG TTCAACCTGTGAGGATCAGTTTCCCCGATGTTACATCGTTTAC
5E	U46939 Griffiths et al. 1997	SEQ U46939	ATGACTAAGAGTCTGCGCATATGCCAGCTATATGTTGACCAAGCA GTAGAGCTGTTCGGCAGCAGTGCCTCAAAAGTACAAATTTACAC
5F	U39937 Li et al. 1995	U39937	ATGCTTAATAGTCCCACTATTTGTGAGTATTTTGTGGGCGTGTG CTTCAACCTGTGAGGATCAGTTTCCCCGATGTTACATCGTTTAC
5G	Herrmann 1998	SEQ35	AACCAAGTATCAGGAGTTTACAGCCAGGTAGTCAGGAGGAACCTT AGTCATCCTGGTGCAGTGGAAAGGCAATTGGATTTAAAGGCAGTCT
5H	Herrmann 1998	SEQ36	AACAATGTAGATGGCTCAGAGAACTCAGGAAATFACCTTTACTT GTATTTAATGGTTGTACATAAGATACAACTCAAGGAACCAAGCT
5I	Herrmann 1998	SEQ41	TACCATGGACGAGCAAGCTTCTGTGTTACCAACAAGGCACTGCAAGG CAAGCATGAATGTGATCGTTTGGGGCAGGGTGATCGGGTTACA
5J	Herrmann 1998	SEQ77	TGGAAAGGAGGACTTGAGCACATTTTAAATGT GGCTCCTGTAAATTTTAAACACATTTGACACATGCTA
6A	U35161 Medstrand et al. 1993	HML-5	ATGCTGAACAGTCTCCTACATGTGTCAGTAACATGTAAATCAAGCT TTGCTCCCCAGTAGAAATATTTCTTAATGCAAGATTAATCAT
6E	HRU46939 Griffiths et al. 1997	HRV5	ATGACTAAGTCTCCTGCTATATGCCAGTATATGTTGACCAAGCA GTAGAGCCTGTTCCGACAGTGCCTCAAAAGTACAAATTTTACAC
6F	Y07725	Foamy virus	TTTTTAAATAGTCCAGCATTTGTTACAGCTGATGTAGTAGATTTA CTAAAGAAATCCCTAATGTACAAGTGTATGTTGATGATATATAT
6G	Tuke et al. 1997	HTLV1	GTTTAAATAGTCCACCCCTGTTGAAATGCAAGTGGCCCATAT CCTGCAGCCCATTCGGCAAGCTTTCCCCCAATGCACTATTCTTCA
6H	M10060, Shimotohno et al. 1985	HTLV2	GTTTAAACACAGCCCACTCTTTCGAACAACAATAGCAGCCCGT CCTCAACCCCATGAGGAAATGTTTCCCACTCGACCATTTGTCCA
6I	Tuke et al. 1997	HIV1	ATGGAAGGATCACCAGCAATATTCAAAGTAGCATGACAAAAAT CTTAGAGCCTTTTAAACAAATAATCCAGACATAGTTATCTATCA
6J	J04542	HIV2	TGGAAGGATCACCAGCAATCTTTCAATTCATGATGAGGCAATC TTAGAACCTTTTCAAAAAGCAAAACCCAGAGCTCATTTCTATCCAA
7A	U60269 Medstrand et al. 1997	HML-6	ATGCTTAAACAGTCTTACGCTATGTGAGCAATTTGTAGGACAGGCA TTAAAGAAGCCTCGAATATGTTTCTACTGCTTACATCATTCAT

7B	Herrmann 1998	SEQ38	ATGCTCAACACCTACGTTAAGTCAGCATTTTGTAGGAAGAGCATT AAAGGACTCTCAGAAATATGTTCCACCTGCCTACATCGTTCAATTA
7C	Herrmann 1998	SEQ56	ATGCTTAACAGCATTAATATCAGCATGTTGTAGGATAGGCATTAAA GGTGCCCTCTGAATATGTTCCACACAGCTACATCCGTCATTATAT
7E	M15122 Moore et al. 1987	MMTV	ATGAAAAATAGCCCTACTTTATGTCAAAAAATTTGTGGACAAAGCT ATATTGACTGTAGGGATAAATACCAAGACTCATATATTGTGCAT
7F	AF038600 Akiyoshi et al. 1998	PERV	TTCAAGAACTCCCCGACCATCTTTGACGAAGCCCTACACAGAGAC CTGGCCAACTTCAGGATCAACACACCTCAGGTGACCCCTCCTCCAG
7G	D10032 Kato et al. 1987	BaEV	TTCAAAAACCTCTCCCACTCTCTTCGATGAGGCTCTCCACAGGGAC CTCACCGACTTCCGGACCCAGCATCCAGAAAGTGACCCCTGCTCCAG
7H	M26927 Delassus et al. 1989	GalV	TTCAAGAACTCTCCCACTCTCTTCGACGAGGCCCTCCACCGAGAT TTGGCTCCCTTAGGGCCCTCAACCCCAAGTGGTGTACTCCAA
7I	J02255 Van Beveren et al. 1981	MoMuLV	TTCAAAAACAGTCCCACTGTTTGTGATGAGGCTGCACAGAGAC CTAGCAGACTTCCGGATCCAGCATCCAGACTTGATCCTGCTACAG
7J	M12349 Sonigo et al. 1986	MPMV	ATGSCCAACAGTCTCTACCTTATGTCAAAAAATATGTGGCCACAGCC ATACATAAGGTTAGACATGCCTGGAAACAAATGTATATTATACAT
8A	U07856, Dangel et al. 1994	HERV-KC4	ATGTTAAATAGTCCCACTGTTTGTCAAACTTTTGTAGGCGAAGCT ATCCAGCCTGTAGAGATCAGTTTCCAGATTTGTGCAGCAAAAAG
8B	Herrmann 1998	SEQ31	ATGTTAAACAGTTCACAGTTTGTCAAACTTTTGTAGGCGAAGCT ATCCAGCTAGTTAGAGATCAATTTCCAGATTGTATACATCAATCAT
8E-8H	human genomic DNA	internal control	100 ng 10 ng 1 ng 0.1 ng
8I-8L	mixed oligo primers	internal control	100 pmol 10 pmol 1 pmol 0.1 pmol

Tabelle 3

A. Humane endogene retrovirale Sequenzen

Typ B Retroviren (HERV-K-Überfamilie)	HML-1 Untergruppe	HML1 (1A) Seq29 (1B*)
	HML-2 Untergruppe	HERV-K10 (2A) U87592 (2B)
	HML-3 Untergruppe	HML-3 (3A) S66676 (3B*) RT244 (3C*) Seq26 (3D*) Seq34 (4A*) Seq42 (4B*) Seq43 (4C*)
	HML-4 Untergruppe	HERV-K-T47D (5A) Seq05 (5B) Seq10 (5C)
	HML-5 Untergruppe	HML-5 (6A)
	HML-6 Untergruppe	HML-6 (7A) Seq38 (7B) Seq56 (7C)
	KC4 Untergruppe	HERV-K-C4 (8A) Seq31 (8B)
	unbestimmt	U39937 (5F)
Typ C Retroviren	HERV-H & verwandte	AF026252 (2J) Seq61 (2K) Seq66 (2L)
	ERV9 & verwandte	ERV9 (4E) Seq49 (4F) Seq59 (4G) Seq60 (4H) Seq63 (4I) Seq64 (4J)
	ERV-FRD	ERV-FRD (3E) Seq46 (3F)
	HERV-ERI Familie	HERV-E(4-1) (2H) Seq32 (2I)
	HERV-I & verwandte	HERV-I (3H) HERV-IP-T47D (3I) Seq65 (3J)
	HERV-T	S71 pCRTK1 (2E) S71 pCRTK2 (2F)
	HERV-W	AF009668 (4L)
Typ D Retroviren	MP(MV verwandte	Seq36 (5H)

Tabelle 3 (Fortsetzung)

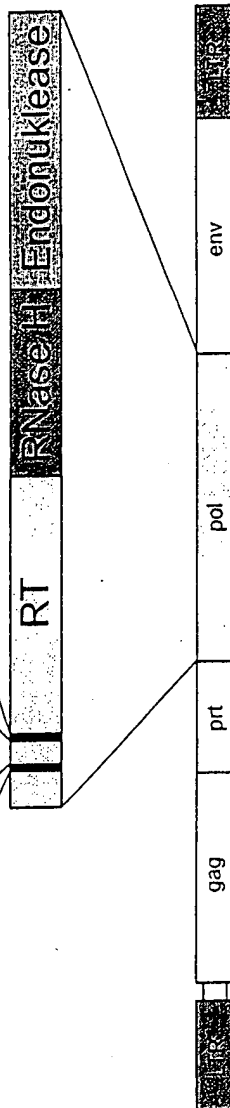
Foamy Virus verwandt	HERV-L & verwandte	G895836 (1E) Seq39 (1F) Seq40 (1G) Seq45 (1H) Seq48 (1I) Seq51 (1J) Seq58 (1K)
unbestimmte retrovirale Elemente		U46939 (5E) Seq35 (5G) Seq41 (5I) Seq77 (5J)
humane nonvirale Retroposons		LINE-1 (3L)

B. Exogene Retroviren

Humane exogene Retroviren	HRV5 (6E) Foamy virus (6F) HTLV-1 (6G) HTLV-2 (6H) HIV-1 (6I) HIV-2 (6J)
endogene Säuger-Retroviren	MMTV (7E) PERV (7F) BaEV (7G) GaLV (7H) MoMuLV (7I) MPMV (7J)

PCR-Amplifikationsprodukt

VLPQG YVMDDI/VLL



HERV

Abb. 2

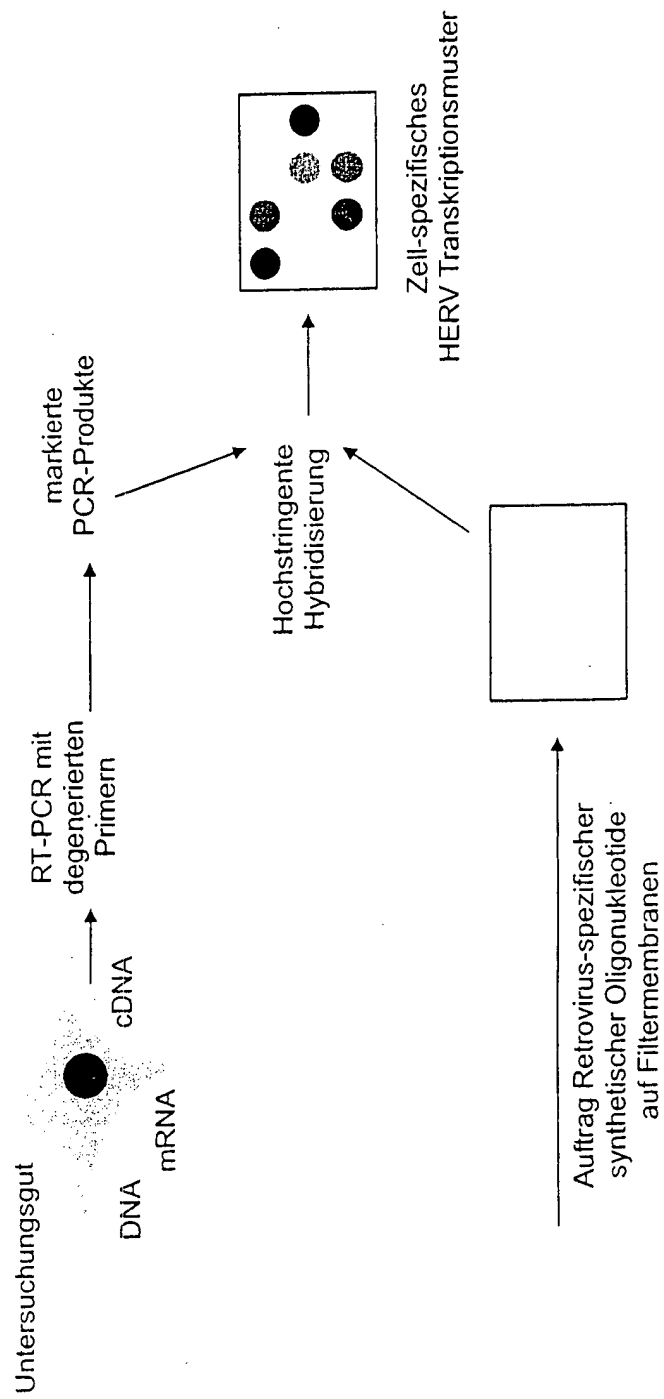


FIG. 3

